

COL·LABORACIONS ESPECIALS

Aplicacions de l'ADN antic en arqueologia. La nova «arqueologia molecular»

Eva Fernández Domínguez, Eduardo Arroyo-Pardo i Daniel Turbón

El gran avenç de les tècniques de biologia molecular ha fet possible la recuperació de material genètic de restes biològiques antigues, fonamentalment a partir de restes òssies i peces dentals. L'estudi d'aquest tipus de material (ADN antic), abundant en el registre fòssil, ha permès donar una resposta a incògnites que difícilment es podrien resoldre d'una altra manera. En el present treball mirarem d'aprofundir en les aplicacions d'aquesta nova disciplina —denominada «paleogenètica» o «arqueologia molecular»— en el camp de l'arqueologia i en discutirem les possibilitats i les limitacions.

Aplicacions de la tecnologia de l'ADN antic a l'arqueologia

Entre les possibles aplicacions dels estudis d'ADN antic en el camp de l'arqueologia destaquen el diagnòstic molecular del sexe, l'establiment de relacions familiars, la identificació personal i la caracterització genètica de les poblacions del passat.

Diagnòstic molecular del sexe

L'assignació genètica del sexe té un interès especial en aquells casos en què la preservació de les restes no fa possible un diagnòstic anatòmic, tal i com acostuma a passar amb individus infantils o quan es troben peces esquelètiques aïllades.

El diagnòstic molecular del sexe es fa a través de l'estudi del gen de l'amelogenina, situat en

els cromosomes sexuals X i Y, i per tant, present tant en homes (XY) com en dones (XX). La tècnica aprofita l'existència de diferències en aquest gen entre el cromosoma Y i el cromosoma X per determinar el sexe de l'individu d'una manera senzilla i ràpida (SULLIVAN [*et al.*], 1993).

Relacions familiars

La determinació de les relacions familiars existents entre individus exhumats pot ajudar en la comprensió dels patrons socials d'enterrament de la població en qüestió. Aquesta inferència resulta especialment interessant en els enterraments múltiples i en necròpolis.

Per establir les relacions de parentiu s'empren habitualment marcadors nuclears —situats en els cromosomes—, ja que presenten una variabilitat més gran en la població i, conseqüentment, una capacitat discriminatòria també més gran. La preservació de l'ADN nuclear o cromosòmic, situat al nucli de la cèl·lula, és habitualment pitjor que la d'altres tipus de material genètic cel·lular: l'ADN mitocondrial. Aquest últim es troba fora del nucli cel·lular, dins uns orgànuls denominats mitocondries, les «màquines» productores d'energia de la cèl·lula. Cada mitocondria conté entre 1.000 i 10.000 còpies d'ADN mitocondrial. Contràriament, només hi ha dues còpies d'ADN nuclear per cèl·lula, de manera que l'estudi només és possible en aquelles restes amb una preservació excel·lent, procedents generalment d'ambients freds (KEYSER-

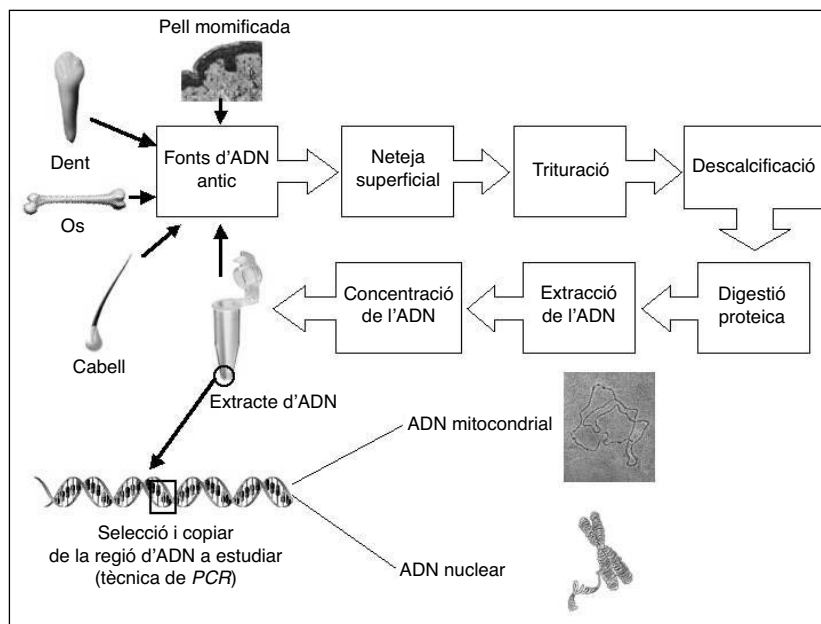


Figura 1. Obtenció i estudi d'ADN antic.

TRACQUI [et al.], 2003; GARCÍA-BOUR [et al.], 2004). En algunes ocasions s'ha combinat la informació de l'ADN nuclear i de l'ADN mitocondrial per aconseguir una discriminació més gran en la determinació de les relacions familiars entre individus (GILL [et al.], 1994).

Identificació personal

La tecnologia de l'ADN antic ha estat aplicada amb èxit en la identificació personal a partir de restes òssies i dentals (JEFFREYS [et al.], 1992). Entre els estudis d'aquest tipus, el de més difusió mediàtica va ser sense dubte el de la família imperial russa (GILL [et al.], 1994). En aquest treball es van emprar, amb èxit, tècniques d'identificació i d'establiment de relacions familiars mitjançant l'estudi de diferents marcadors genètics: ADN mitocondrial i ADN nuclear. L'estudi genètic va revelar que dos dels esquelets eren els pares de tres dels altres. Els dos individus restants, no relacionats genèticament amb la resta, corresponien, probablement, als dos servents assassinats amb la família. La comparació de l'ADN mitocondrial de les mencionades restes amb el de descendents vius actuals per línia materna va servir per demostrar que es tractava de les de la família imperial russa.

Una altra aproximació interessant és la caracterització genètica de personatges històrics. El 2001 es va publicar una seqüència d'ADN mitocondrial d'unes restes atribuïdes a l'evangelista Lluc, procedents d'un sepulcre de Pàdua (VERNESI [et al.], 2001).

Epidemiologia

Una altra aplicació de l'ADN antic és la caracterització genètica de virus i bacteries. Aquestes anàlisis permeten, per una banda, veure l'evolució dels patògens amb el temps i, per una altra, determinar la incidència de malalties infeccioses en les poblacions del passat.

Caracterització genètica de les poblacions del passat

La possibilitat de recuperar informació genètica de restes antigues permet analitzar directament la variabilitat genètica de les poblacions del passat. Això fa possible l'estudi temporal dels canvis genètics en aquestes poblacions i permet, a més, verificar les hipòtesis plantejades des d'altres disciplines referents a migracions antigues i barreja poblacional. Així, l'estudi de poblacions aborígens americanes antigues ha permès conèixer millor el procés de poblament d'Amèrica (GARCÍA-BOUR [et al.], 2004). De la

mateixa manera, s'ha comparat la composició genètica de les poblacions neolítiques de Síria amb l'actual per tal de determinar l'impacte demogràfic de la difusió neolítica a Europa (FERNÁNDEZ, 2005).

Limitacions dels estudis d'ADN antic

L'obtenció d'informació genètica a partir de restes antigues no sempre és possible. Hi ha certes limitacions, relacionades amb l'estat de preservació de la mostra o relatives a la tècnica d'anàlisi, que dificulten o impedeixen, en determinades ocasions, la consecució dels estudis amb èxit. A continuació citarem les més importants.

Degradació del material genètic

Després de la mort de l'organisme, comença un procés de degradació molecular que afecta també l'ADN. Les principals manifestacions de la degradació del material genètic són la fragmentació de les cadenes i certes modificacions químiques que poden afectar o no la informació continguda. La magnitud i la velocitat de degradació del DNA ve determinada per les condicions de l'entorn de deposició, essencialment la temperatura i la humitat.

La presència de temperatures baixes durant la deposició afavoreix la preservació del material genètic (BURGER [*et al.*], 1999). Això és degut al fet que, a temperatures baixes, s'alenteixen les reaccions químiques responsables de la degradació orgànica. S'ha calculat que una reducció en la temperatura de 20° C provoca una disminució d'entre 10 i 25 cops en la taxa d'aquestes reaccions (HÖSS [*et al.*], 1996*b*). De fet, les mostres més antigues de les quals s'ha aconseguit recuperar DNA de manera reproduïble procedeixen de llocs amb baixa temperatura. Aquest és el cas dels exemplars de mamut analitzats (WILLERSLEV [*et al.*], 2003; DEBRUYNE [*et al.*], 2003), d'alguns dels espècimens de Neandertal estudiats fins a la data (KRINGS [*et al.*], 1997; SCHMITZ [*et al.*], 2002) o de l'home del Tirol (HANDT [*et al.*], 1994). S'ha postulat

també que la presència d'elevades temperatures després de la deposició d'una resta poden afavorir la deshidratació parcial del DNA, i protegir-lo de la degradació (LINDAHL, 1993).

Un cop exhumades les restes, la temperatura a la qual s'emmagatzemen també juga un paper important en el procés de degradació del material genètic. En general és recomanable que la mostra, un cop exhumada, sigui processada com més aviat millor. Si això no és possible, es recomana un emmagatzematge en fred, a -20° C, ja que s'ha demostrat que aquelles restes que han romàs durant un temps llarg a temperatura ambient presenten alteracions de l'ADN que molts cops impossibiliten l'obtenció d'informació genètica fiable.

Pel que fa a la humitat, un excés té un efecte advers sobre la preservació del material genètic, ja que afavoreix les reaccions de degradació.

Inhibició

Una bona preservació del material genètic és condició necessària però no suficient per garantir la recuperació d'informació genètica mitjançant tècniques convencionals de biologia molecular. La tècnica de la PCR (*Polymerase Chain Reaction* o 'reacció en cadena de la polimerasa'), que permet seleccionar i obtenir múltiples còpies de la regió del DNA que es vol analitzar, pot resultar inhibida per alguns compostos coneguts amb el nom genèric d'inhibidors. La presència d'inhibidors en els extractes de DNA d'os, dent o teixit antic és molt comuna i està documentada des de l'inici de la disciplina de la paleogenètica. La naturalesa d'aquests inhibidors és encara desconeguda, però s'han proposat diverses molècules candidates, essencialment compostos del sòl, com els àcids húmics o fúlvics, o subproductes de la degradació orgànica. S'han descrit diverses modificacions dels protocols tècnics convencionals per aïllar els inhibidors, o mirar de contrarestar-ne els efectes. Bona part d'aquestes mesures incrementen el risc de contaminació de la mostra amb DNA exogen, i no resulten per tant recomanables. Una forma que s'ha provat efectiva és l'emmagatzematge dels extractes en fred durant alguns dies abans de fer la PCR (MONTIEL [*et al.*], 1997).

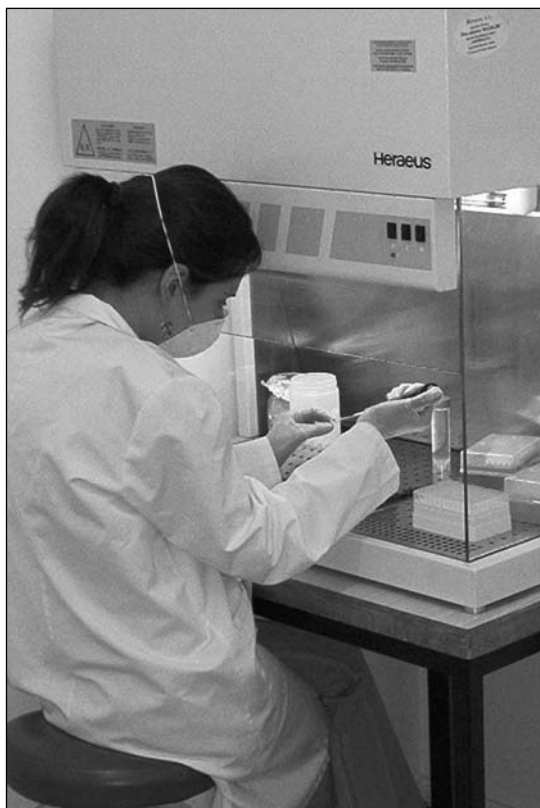


Figura 2. Laboratori d'ADN antic.

Contaminació

La contaminació de la mostra amb ADN d'origen extern és l'etern problema dels estudis d'ADN antic. L'elevada sensibilitat de la tècnica de PCR fa que, en absència o quan hi ha una quantitat molt baixa d'ADN endogen, es produeixi l'amplificació preferent d'ADN d'un altre origen. Les etapes en què es pot produir la contaminació són:

1. Durant la deposició de les restes, per traspàs d'ADN entre organismes pròxims.
2. Durant l'excavació, per part del personal arqueològic.
3. Durant el dipòsit de la mostra en un museu, per part del personal encarregat de la conservació.
4. Durant l'anàlisi genètica al laboratori, per part del personal investigador o per material genètic d'anteriors treballs.

La contaminació durant la primera etapa fa referència, essencialment, a la colonització de les restes per microorganismes, fongs i fauna putrefactiva diversa. La contaminació amb ADN

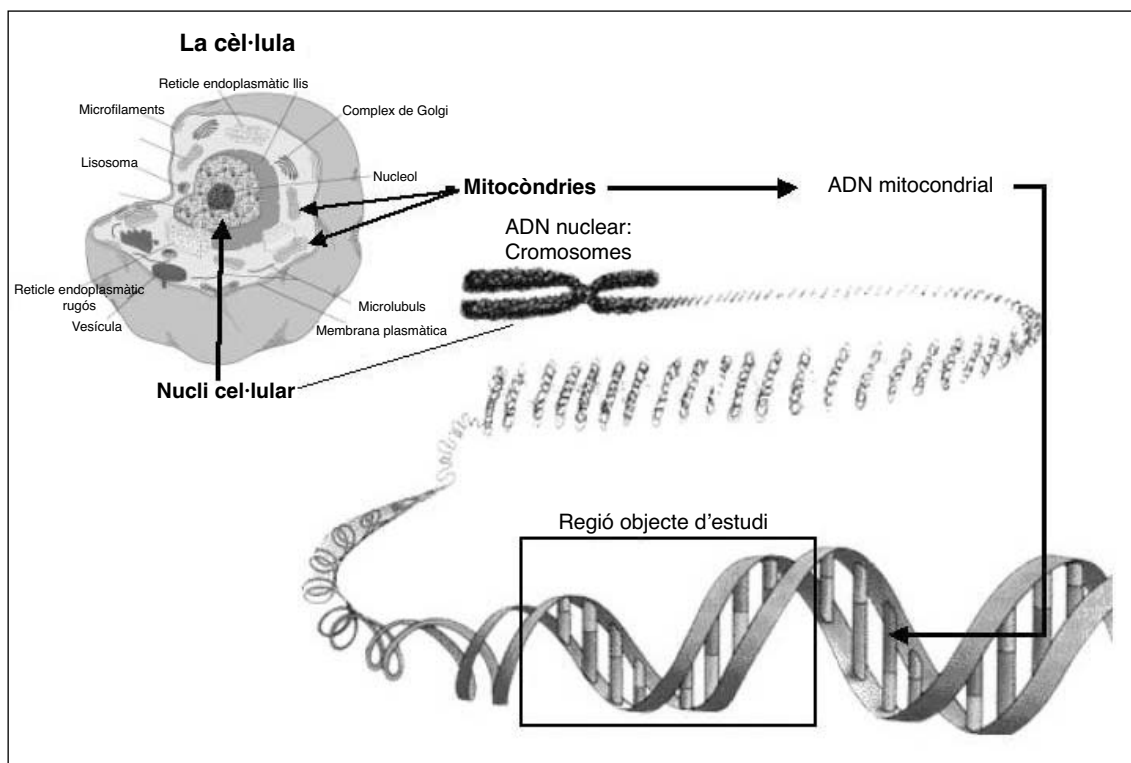


Figura 3. L'ADN a la cèl·lula.

d'una espècie diferent de la que es pretén estudiar no suposa un problema si la regió d'aquest ADN que es vol analitzar està diferenciada pel que fa a espècie.

La contaminació amb ADN humà resulta molt més problemàtica, ja que pot ser responsable de l'aparició de falsos positius si no s'aconsegueix identificar la font d'origen. L'única manera de controlar aquest tipus de contaminació és disposar de la informació genètica de la regió de l'ADN que es vol estudiar. En el cas concret del personal d'excavació, es recomana seguir un conjunt de mesures per tal d'evitar-la i/o minimitzar-la:

- Seleccionar quan sigui possible peces esquelètiques netes i sense fissures i exhumar-les en primer lloc.
- Durant l'exhumació i processat de les mostres, fer ús de guants i màscara i emprar instrumental net i, si pot ser, d'un sol ús.
- Deixar assecar el material humit en una habitació aïllada abans de guardar-lo, per tal d'evitar la proliferació de microorganismes.
- No netejar el material excavat, perquè les substàncies emprades en la neteja, si no estan tractades convenientment, poden arrossegar ADN contaminant o inhibir la PCR en cas de penetrar en la mostra.
- Dipositar la peça, un cop neta i eixuta, a l'interior de recipients estèrils.

Per mirar de controlar la contaminació introduïda durant el processament de la mostra al laboratori, a més de la citada caracterització genètica del personal investigador, és obligat l'ús de «blancs» o «controls», que contenen només els reactius emprats en les anàlisis i que es processen paral·lelament a les mostres.

A pesar de les citades limitacions, inherents a la tècnica d'anàlisi i imposades per l'estat de preservació de la mostra, són molts els treballs que evidencien que l'obtenció d'informació genètica a partir de mostres arqueològiques és possible. En el camp de l'arqueologia, l'ADN antic ofereix moltes i interessants possibilitats. El treball conjunt d'arqueòlegs i paleogenetistes sembla, doncs, necessari per a la comprensió del passat de les poblacions humanes.

Per a més informació sobre ADN antic recomanem visitar la pàgina web:
<http://www.ucm.es/info/genforen/index.htm>

Abstract

*Applications of ancient DNA in archaeology.
 The new «Molecular Archaeology»*

The possibility of recovering genetic information from fossil remains, offers a unique opportunity to solve certain common questions in archaeology. Between all possible applications of ancient DNA technology in archaeology and anthropology, it should be emphasized the sex diagnosis, the establishment of kinship among exhumed individuals, personal identification, and genetic characterisation of past populations. The preservation of DNA in the analyzed remains will condition the success in the performed analysis. Other technical limitations are the co-extraction, with genetic material, of compounds capable of inhibiting the experimental processes needed to obtain genetic information, and also contamination of samples with exogenous DNA. These difficulties, however, can be usually solved by means of the application of several simple precautions.

Resumen

*Aplicaciones del ADN antiguo en arqueología.
 La nueva «arqueología molecular»*

La posibilidad de recuperar información genética a partir de restos fósiles ofrece una oportunidad única para dar respuesta a algunas cuestiones planteadas desde otras disciplinas.

Entre las aplicaciones de interés de la tecnología del ADN antiguo en el campo de la arqueología y la antropología destacan el diagnóstico molecular del sexo, el establecimiento de relaciones familiares entre individuos exhumados, la identificación personal y la caracterización genética de las poblaciones del pasado. El éxito en la consecución de estos estudios está condicionado principalmente por el estado de preservación del ADN en los restos analizados. Otras limitaciones de la técnica son la extracción, junto con el material genético, de moléculas que pueden inhibir los procesos experimentales necesarios para obtener la información genética y la contaminación de las muestras con ADN procedente de otras fuentes. Con todo, estas últimas citadas dificultades pueden controlarse mediante la aplicación de ciertas sencillas precauciones.

Referències bibliogràfiques

- BURGER, J.; HUMMEL, S.; HERRMANN, B.; HENKE, W. (1999). «DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains». *Electrophoresis*, núm. 20, p. 1722-1728.
- DEBRUYNE, R.; BARRIEL, V.; TASSY, P. (2003). «Mitochondrial cytochrome b of the Lyakhov mammoth (Proboscidea, Mammalia): new data and phylogenetic analyses of Elephantidae». *Mol Phylogenet Evol*, núm. 26 (3), p. 421-434.
- FERNÁNDEZ, E. (2005). *Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea*. Tesi doctoral presentada a la Universitat de Barcelona.
- GARCÍA-BOUR, J.; PÉREZ-PÉREZ, A.; ÁLVAREZ, S.; FERNÁNDEZ, E.; LÓPEZ-PARRA, A. M.; ARROYO-PARDO, E.; TURBÓN, D. (2004). «Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia: ancient mtDNA sequences and Y-chromosome STR characterization». *Am J Phys Anthropol*, núm. 123 (4), p. 361-370.
- GILL, P.; IVANOV, P. L.; KIMPTON, C.; PIERCY, R.; BENSON, N.; TULLY, G.; EVETT, I.; HAGELBERG, E.; SULLIVAN, K. (1994). «Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis». *Nat Genet*, núm. 6 (2), p. 130-135.
- HANDT, O.; RICHARDS, M.; TROMMSDORFF, M.; KILGER, C.; SIMANAINEN, J.; GEORGIEV, O.; BAUER, K.; STONE, A.; HEDGES, R.; SCHAFFNER, W.; UTERMANN, G.; SYKES, B.; PÄÄBO, S. (1994). «Molecular Genetic Analysis of the Tyrolean Ice Man». *Science*, núm. 264, p. 1775-1778.
- JEFFREYS, A. J.; ALLEN, M. J.; HAGELBERG, E.; SONNBERG, A. (1992). «Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis». *Forensic Sci Int*, núm. 56 (1), p. 65-76.
- KEYSER-TRACQUI, C.; CRUBÉZY, E.; LUDÉS, B. (2003). «Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia». *Am J Hum Genet*, núm. 73 (2), p. 247-260.
- KRINGS, M.; STONE, A.; SCHMITZ, R.; KRAINITZKI, H.; STONEKING, M.; PÄÄBO, S. (1997). «DNA sequences and the origin of the modern humans». *Cell*, núm. 90, p. 19-30.
- LINDAHL, T. (1993). «Instability and decay of the primary structure of DNA». *Nature*, núm. 362, p. 709-715.
- MONTIEL, R.; MALGOSA, A.; SUBIRÁ, E. (1997). «Overcoming PCR inhibitors in ancient DNA extracts from teeth». *J Ancient Biomol*, núm. 1, p. 221-225.
- SCHMITZ, R. W.; SERRE, D.; BONANI, G.; FEINE, S.; HILLGRUBER, F.; KRAINITZKI, H.; PÄÄBO, S.; SMITH, F. H. (2002). «The Neandertal type site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 99 (20), p. 13342-13347.
- SULLIVAN, K.; MANNUCCI, A.; KIMPTON, C.; GILL, P. (1993). «A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin». *BioTechniques*, núm. 15 (4), p. 636-641.
- VERNESI, C.; DE BENEDETTO, G.; CARAMELLI, D.; SECCHIERI, E.; SIMONI, L.; KATTI, E.; MALASPINA, P.; NOVELLETTO, A.; MARIN, V. T. W.; BARBUJANI, G. (2001). «Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 98 (23).
- WILLERSLEV, E.; HANSEN, A. J.; BINLADEN, J.; BRAND, T. B.; GILBERT, M. T.; SHAPIRO, B.; BUNCE, M.; WIJF, C.; GILICHINSKY, D. A.; COOPER, A. (2003). «Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments». *Science*, núm. 2 (5620), p. 791-795.

Eva FERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ és doctora en Biologia per la Universitat de Barcelona. En la seva tesi doctoral va estudiar el fenomen de difusió del neolític i els orígens genètics de la població europea a través de l'anàlisi genètica de mostres de jaciments neolítics del Pròxim Orient i la península Ibèrica. Actualment és investigadora al Departament de Toxicologia i Legislació Sanitària de la Universitat Complutense de Madrid, on continua treballant en aquesta mateixa línia d'investigació. Ha participat, també, en el projecte d'identificació genètica de les restes de Cristòfor Colom.

Eduardo ARROYO és professor contractat del Departament de Toxicologia i Legislació Sanitària de la Universitat Complutense de Madrid, on dirigeix el Laboratori de Genètica Forense i Genètica de Poblacions. Ha treballat en diverses línies d'investigació dins l'àmbit de la genètica de poblacions i l'ADN antic. Entre els seus últims projectes hi ha l'estudi genètic de les poblacions del Pirineu. Forma part, també, de l'equip d'identificació genètica de les restes de Cristòfor Colom.

Daniel TURBÓN és catedràtic d'Antropologia Física de la Universitat de Barcelona, on imparteix l'assignatura d'Evolució humana des del 1984. Ha participat i dirigit diversos projectes d'investigació en el camp de l'evolució humana. Va ser un dels pioners de l'ADN antic a Espanya. En aquesta línia, els seus treballs han contribuït a la comprensió del poblament de l'Illa de Pasqua, d'Amèrica i, més recentment, d'Europa. Ha participat, també, en el projecte d'identificació genètica de les restes de Cristòfor Colom.